

学位授与番号	医博甲第1432号
学位授与年月日	平成12年6月30日
氏 名	増 富 健 吉
学位論文題目	Telomerase activity reconstituted in vitro with purified hTERT and hTR (精製 hTERT および hTR によるテロメラーゼ活性の試験管内再構成)
論文審査委員	主 査 教 授 中 尾 眞 二 副 査 教 授 井 上 正 樹 教 授 山 本 博

内容の要旨及び審査の結果の要旨

テロメアは真核細胞の線状染色体末端に存在する繰り返し配列で、染色体の安定性等に関与する機能構造体である。テロメラーゼは染色体末端にテロメア繰り返し配列を付加する特異的逆転写酵素である。ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) はテロメラーゼの触媒活性サブユニットとして同定され、その活性には鋳型 RNA としてヒトテロメラーゼ RNA サブユニット (hTR) を必要とすることが知られている。しかし、これまで組み換え型精製 hTERT と hTR を用いた in vitro 再構成系が報告されていないので、hTERT と hTR のみがテロメラーゼ活性の必要最少成分であるかどうかは明らかではなかった。

そこで、昆虫細胞発現系を用いて、可溶性組換え型ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) の発現・精製を行った。昆虫細胞発現ベクターである pVL1393 の多角体プロモーターの下流に N 末端 FLAG 標識 hTERT を組み込んだ pVL1393-FLAG-hTERT を作成し、トランスフェクション法で Sf9 細胞に導入し、組換え型 FLAG-hTERT バキュロウイルスを作成した。このウイルスを用いて FLAG-hTERT の発現・精製を行った。

組換え型 FLAG-hTERT は生化学的な方法を用いて分画したところ、約 127 Kdalton の単一バンドとして精製された。精製 FLAG-hTERT は、in vitro で合成後精製した hTR の存在下で用量依存的なテロメラーゼ活性を示した。活性中心である金属結合モチーフ (VDV モチーフ) に変異を加えた精製変異型 hTERT(D712A) は触媒活性を示さなかった。この結果は、in vitro で観察されたテロメラーゼ活性が hTERT の触媒活性に依存していることを示した。hTR をプローブとしたゲルシフトアッセイ (EMSA) で、hTERT は hTR と量依存的に特異的複合体を形成することが示された。以上の結果より、hTERT と hTR の 2 つのサブユニットがテロメラーゼ最少必要成分であることが in vitro 再構成系で示された。熱ショックタンパクの一種の Hsp90 が p23 と共にテロメラーゼ複合体の構成成分として機能することが報告されている。Hsp90 の特異的な阻害剤であるゲルダナマイシンは、in vitro 再構成テロメラーゼ活性に全く影響を与えなかった。In vitro で再構成したテロメラーゼ活性に、テロメラーゼ活性を有さない正常ヒト線維芽細胞である TIG3 の抽出液を加えると、テロメラーゼ活性が 30 倍程度増強された。TIG3 細胞抽出液によるテロメラーゼ活性の増強効果に対して、ゲルダナマイシンは部分的に阻害効果を示した。本研究は hTERT と hTR からなるテロメラーゼ活性系を世界で初めて in vitro で再構成することに成功したものであり、テロメラーゼ活性の制御に関わる未知因子の同定と、テロメラーゼ活性を標的とした新たな薬剤の開発に非常に有用な研究成果として高く評価された。